

УДК 618.1: 579.2

Усвоение лактулозы и различных растительных камедей молочнокислыми бактериями, выделенными из грудного молока

Л.В. Даниелян¹, Н.Б. Чичоян², Г.Г. Оганесян¹

¹Научно-производственный центр “Армбиотехнология” НАН РА

²ЕГМУ им. М. Гераци, кафедра фармакогнозии
0056, Ереван, ул. Гюрджяна, 14

Ключевые слова: лактулоза, гуммиарабик, камедь абрикосового дерева, пробиотик, пребиотик, лактобациллы грудного молока

Исследования последних лет показали, что кроме питательных веществ, необходимых для развития новорожденных, грудное молоко содержит полезные микроорганизмы (пробиотики), которые, заселяя желудочно-кишечный тракт ребенка, повышают иммунитет и создают барьер против возможных инфекций [6,11,19]. Более того, в грудном молоке, в отличие от детского питания, содержится большое количество сложных олигосахаридов, главным образом галактоолигосахариды (ГОС), играющих роль пребиотиков, способствующих росту и поддержанию пробиотических бактерий в кишечнике младенца [1-4].

В попытке сделать детское питание близким по качеству к грудному молоку, некоторые компании добавляют различные олигосахариды, которые, хотя и структурно различаются, однако обладают характерными для пребиотиков иммуномодулирующими эффектами [8,9,12]. Олигосахариды грудного молока (ОГМ) после лактозы и липидов являются третьим по величине компонентом грудного молока. Их высокая концентрация, а также структурное разнообразие и сложность уникальны для грудного молока. Другие природные ресурсы недоступны, химический или ферментативный синтез является слишком сложным и дорогостоящим для коммерческого использования в детской смеси. ОГМ считаются полезными для здоровья и профилактики заболеваний грудного ребенка [7,14,15]. Поскольку детские питательные смеси лишены потенциальных преимуществ ОГМ, некоторые компании по производству детского питания начали поиск недорогих альтернативных пребиотиков ГОС, фруктоолигосахаридов (ФОС) или инулина, которые имитируют пребиотические эффекты грудного молока и способствуют развитию бактериальной микрофлоры грудного молока [2,7,15,18].

Целью этой работы было изучение влияния ряда синтетических и природных пребиотиков на рост и размножение лактобактерий, выделенных из грудного молока, для создания симбиотических препаратов перорального применения.

Материал и методы

Штамм молочнокислых бактерий (МКБ) *Lactobacillus spp.* LH15 выделен нами из грудного молока [10]. Штаммы лактобацилл содержались на агаризованной среде LAPTg [21]. В связи с отсутствием минимальной среды для выращивания МКБ опыты по изучению влияния различных источников углерода проводились в модифицированной среде LAPTM (пептон – 5 г/л, триптон – 5 г/л, дрожжевой экстракт – 3 г/л, Твин 80 – 1 мл/л). В качестве основного источника углерода в среду добавляли по 10 г/л глюкозы, лактулозы (Solvay pharma, Duphalac), камедь (*gummi armeniacae*) абрикосового дерева (КАД), полученную на кафедре фармакогнозии ЕГМУ им. Гераци, и гуммиарабик (*gummi arabicae*) из сенегальской (*Acacia senegal L.*) акации (Acacia, NF, Medisca, USA). В качестве посевного материала использовалась суточная культура изучаемого штамма в отношении 1:20. Культуры выращивались в колбах Эрленмейера емкостью 250 мл, на водяной качалке, при температуре 37°C и периодически брались пробы для определения оптической плотности (ОП) при 590 нм. После 7-часового роста на качалке инкубация культур продолжалась в стационарных условиях и после 24 часов снова измерялась ОП.

Статистический анализ полученных данных осуществляли с использованием компьютерного теста Стьюдента, принимая уровень $p < 0.05$ достаточным для достоверной разницы в результатах.

Результаты и обсуждение

Известно, что под влиянием очень высоких температур – 120 – 130 °C в коровьем молоке образуется олигосахарид, названный лактулозой, способный специфически стимулировать рост бифидо- и молочнокислых бактерий [14,16,17, 20]. В грудном молоке присутствуют аналоги лактулозы, так называемые бифидогенные факторы, которые играют важную роль в формировании кишечного микробиоценоза у ребенка [12]. Позднее лактулоза была синтезирована химическим способом и в настоящее время широко применяется для лечения кишечных расстройств и дисбактериозов [5,13]. Работы по изучению усвоения лактулозы МКБ, выделенными из грудного молока, ранее не проводились. В связи с этим очень важно изучить эффективность усвоения лактулозы штаммами, выделенными из грудного молока, для ее использования в качестве добавки, предназначенной как для детей, так и с целью создания симбиотиков для кормящих

матерей. Для повышения эффективности пробиотики и пребиотики используют совместно в форме синбиотиков [3, 5], перед созданием которых необходимо изучить эффективность усвоения пребиотика пробиотическим штаммом.

На рис.1 представлены данные по изучению скорости роста и накопления биомассы у штамма *Lactobacillus spp.* LH15 на среде, содержащей в качестве основного источника углерода лактулозу. В качестве контроля проверялся рост культур на LPTM средах и без добавления глюкозы. Как видно из рис.1, исследуемая культура одинаково хорошо растет как на глюкозе, так и на лактулозе.

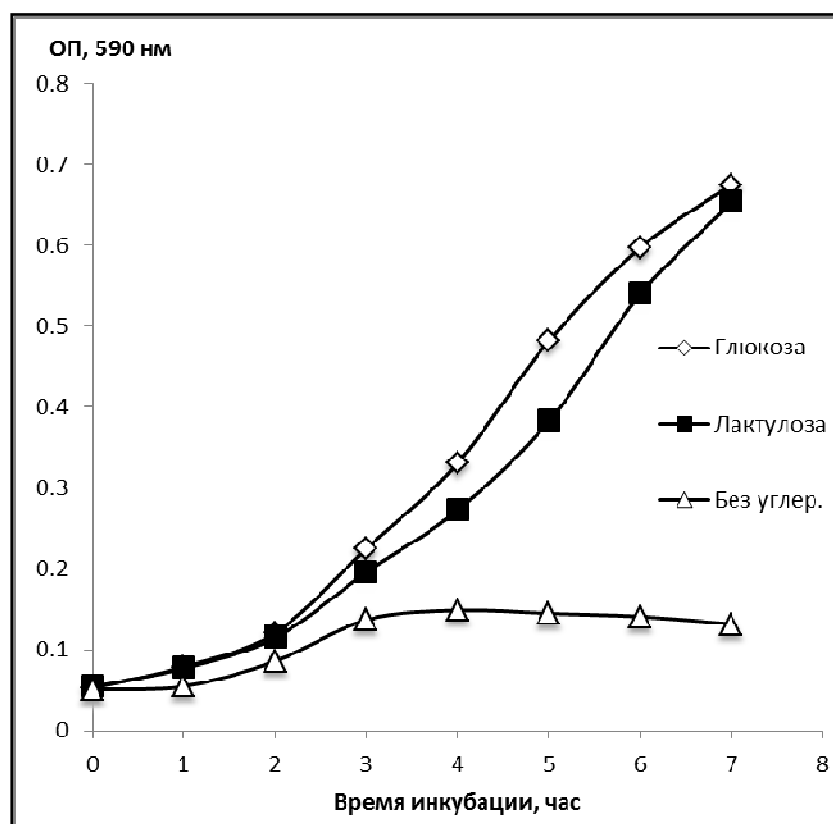


Рис.1. Динамика роста и накопления биомассы штамма LH15 в LPTM бульоне, содержащем лактулозу

Из природных полисахаридов в качестве основного источника углерода нами были изучены экссудаты (камеди) абрикосового дерева и сенегальской акации. Оба они, подобно пребиотикам, не усваиваются в организме человека. Камедь абрикосового дерева по своему химическому составу и морфологическим свойствам резко отличается от камеди сенегальской акации. Она более вязкая и содержит до 84 % глюкуроновой

кислоты, тогда как камедь акации – всего 17 %. Если в составе гуммиарабика преобладают арабиноза и галактоза (до 83 %), то в составе КАД обнаружены арабиноза, галактоза, ксилоза и глюкоза в суммарном количестве около 17 %. По спецификации ФАО (1990), камедь сенегальской акации, допущенная к использованию в пищевой промышленности (E414), содержит рамнозу (12–14%), арабинозу (24–29%), галактозу (36–42%), глюкуроновую кислоту (16–17%), азот (0.327–0.365%) и протеины (2.16–2.41%) [18]. В наших исследованиях в составе КАД протеины не обнаружены.

В народной медицине абрикосовую камедь применяют как обволакивающее средство при желудочно-кишечных заболеваниях (гастритах, энтеритах, колитах, диареях и т.д.) и как противоядие — при отравлениях.

Кривые роста биомассы штамма на среде LАРТМ, содержащей гуммиарабик, и на контрольных средах представлены на рис.2.

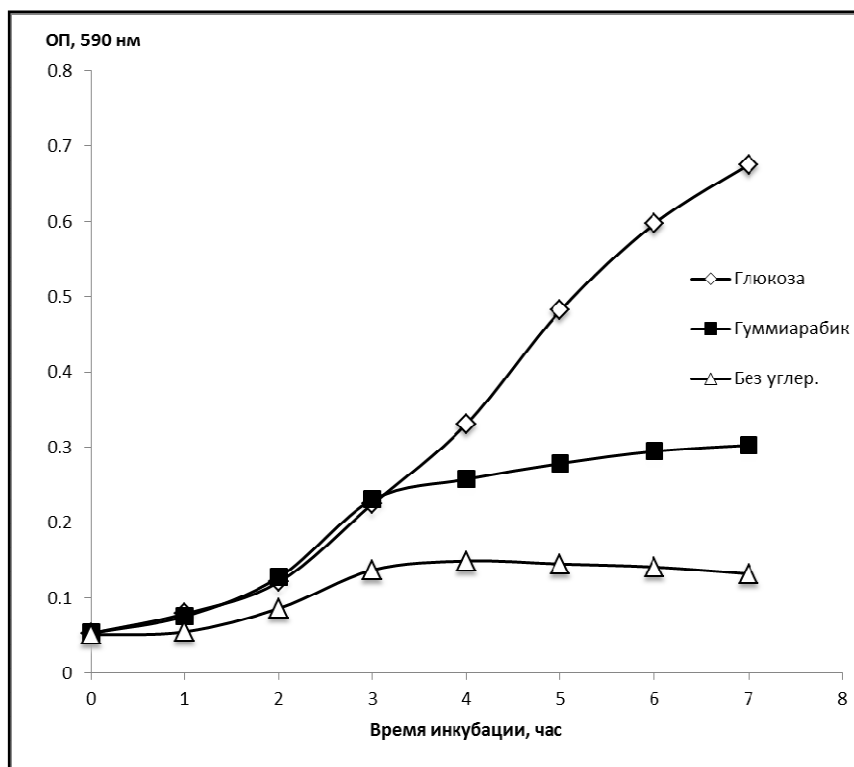


Рис.2. Динамика роста и накопления биомассы штамма LH15 в LАРТМ бульоне, содержащем гуммиарабик

Анализ кривых роста указывает на то, что гуммиарабик в течение 3 часов интенсивно поддерживает рост бактериальной культуры наравне с глюкозной культурой, после чего рост резко замедляется и к 8-му часу почти останавливается.

Данные по изучению влияния экссудата абрикосового дерева в качестве основного источника углерода на рост и накопление биомассы штамма LH15 представлены на рис. 3. Характер роста МКБ на среде с камедью абрикосового дерева аналогичен с гуммиарабиком. Но в отличие от роста на других источниках углерода, культура после короткой лаг-фазы сразу переходит в логарифмическую фазу и интенсивно растет в течение 3 часов. После истощения легкоусвояемых компонентов камеди культура переходит в стационарную фазу роста и ОП не меняется до 7 ч., тогда как у культуры, растущей в среде без добавок, начиная с 6-го часа наблюдалась тенденция к снижению количества биомассы. Двухкомпонентность кривых роста свидетельствует о наличии в составе гуммиарабика и КАД небольшого количества (менее 10%) легкоусвояемых источников углерода и почти неусвояемых полисахаридов.

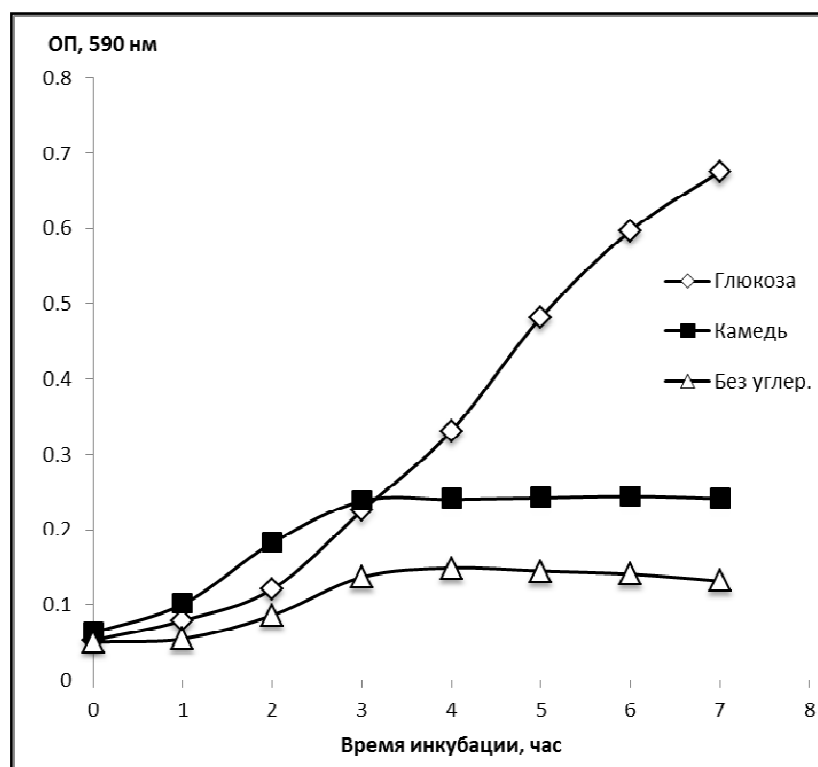


Рис. 3. Динамика роста и накопления биомассы штамма LH15 в LАРТМ бульоне, содержащем 1% сухого экссудата абрикосового дерева

Как видно из представленной на рис. 4 гистограммы, на средах, содержащих глюкозу и лактулозу, ОП продолжает расти, достигая значений 1,2 -1,4, тогда как на среде без добавления углеродсодержащих веществ из-за гибели и лизиса клеток она резко падает. В обоих случаях в течение 24 часов изменений ОП камедей абрикоса и акации не проис-

ходит, что может свидетельствовать о стабилизирующей и протекторной природе исследованных полисахаридов. Гуммиарабик и другие камеди способны образовывать вокруг бактериальной клетки капсулу, которая защищает ее от воздействия внешних факторов. Микрокапсулирование с применением камедей широко используется при изготовлении медицинских препаратов, содержащих живые пробиотические микроорганизмы с целью продления их срока хранения.

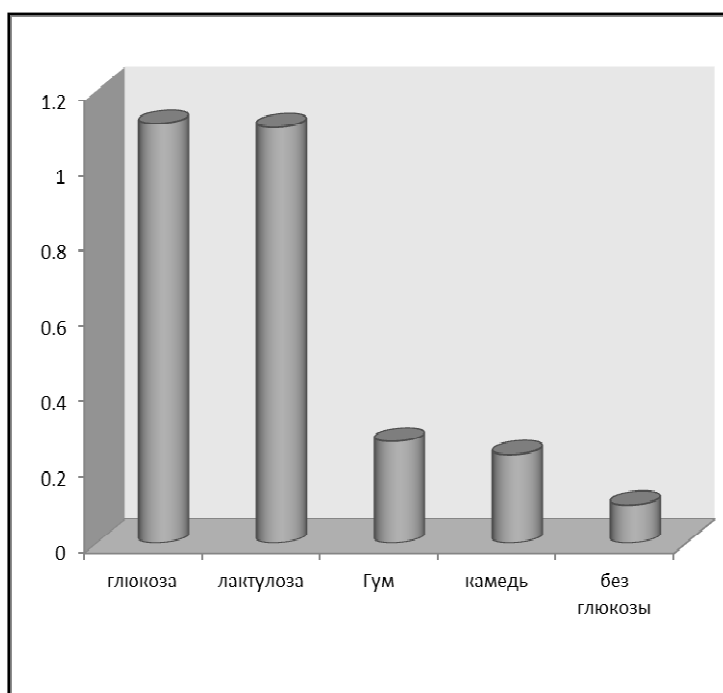


Рис. 4. Накопление биомассы штамма LH15 после 24 часов роста в стационарных условиях в присутствии различных источников углерода

Таким образом, было показано, что по эффективности использования и накопления биомассы лактулоза не уступает глюкозе, в то время как камеди сенегальской акации и абрикосового дерева только частично перевариваются лактобактериями и образуют намного меньше биомассы. С другой стороны, было выявлено, что растительные камеди защищают лактобактерии от воздействия вредных факторов окружающей среды и, таким образом, способствуют долговременному сохранению их жизнеспособности.

Указанные камеди можно рекомендовать для включения в состав детского питания с целью поддержания и улучшения жизнеспособности кишечной микрофлоры.

Поступила 18.05.17

Լակտուլոզի և տարբեր բուսական կամեդների յուրացումը մայրական կաթից մեկուսացված բակտերիաների կողմից

Լ.Վ. Դանիելյան, Ն. Բ. Չիչոյան, Հ. Գ. Հովհաննիսյան

Ուսումնասիրվել է լակտուլոզի և բուսական ծագման կամեդների յուրացումը մայրական կաթից մեկուսացված լակտոբացիլների կողմից, որպես մայրական կաթի օլիգոսախարիդների փոխարինիչներ նրանց մանկական սննդի կազմում ներառելու նպատակով: Ցույց է տրվել, որ լակտուլոզը իր յուրացման արդյունավետությամբ և կենսազանգվածի կուտակման մակարդակով չի զիջում գլյուկոզին, այն դեպքում, երբ Սենեգալիան ակացիայի և ծիրանենու կամեդները միայն մասնակիորեն են յուրացվում լակտոբացիլների կողմից՝ առաջացնելով անհամեմատ պակաս կենսազանգված: Մյուս կողմից հայտնաբերվել է, որ բուսական կամեդները պաշտպանում են լակտոբացիլներին շրջակա միջավայրի վնասակար գործոնների ազդեցությունից՝ նպաստելով նրանց կենսունակության երկարատև պահպանմանը:

Այսպիսով նշված կամեդները կարելի է ներառել մանկական սննդում աղիների կենսագործունեության բարելավման և օգտակար միկրոֆլորայի պահպանման նպատակով:

The assimilation of lactulose and various plant gums by lactic acid bacteria isolated from breast milk

L. V. Danielyan, N. B. Chichoyan, H. G. Hovhannisyan

The assimilation of lactulose and plant derived gums by lactobacilli isolated from breast milk, as breast milk oligosaccharides substitutes for application in infant food formula, has been studied. It has been shown that by effectiveness of utilization and biomass accumulation lactulose is not inferior to glucose, while Senegal acacia and apricot tree gums are only partially digested by lactobacilli and produce less biomass. On the other hand, it has been found out that plant gums protect lactobacilli from the impact of harmful environmental factors, thus contributing to long-term preservation of their viability.

Thus, the investigated gums can be included in baby food formula to improve the viability of intestinal microflora and its maintenance.

Литература

1. Bode L. Recent Advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *J. Nutr.*, 2006, 136: 2127–2130.
2. Bode L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 2012, 22:1147–62.
3. Bode L., Jantscher-Krenn E. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Adv. Nutr.*, 2012, 3, p. 3835–3915.
4. Blank D., Dotz V., Geyer R., Kunz C. Human milk oligosaccharides and Lewis blood group: individual high-throughput sample profiling to enhance conclusions from functional studies. *Adv. Nutr.*, 2012, 3:440–49S.
5. Collins M.D., Gibson G.R. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1999, vol.69, 5: 1052S–1057S.
6. Costalos C., Kapiki A., Apostolou M., Papathoma E. The effect of a prebiotic 2 supplemented formula on growth and stool microbiology of term infants. *Early Hum. Dev.*, 2008, 84:45–49.
7. Chaturvedi P., Warren C.D., Altaye M., Morrow A.L., Ruiz-Palacios G. et al. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology*, 2001, 11:365–72.
8. Chaturvedi P., Warren C.D. et al. Survival of human milk oligosaccharides in the intestine of infants. In: Newburg, D.S., editor. *Bioactive Components of Human Milk*. Springer; New York, 2001, p. 315–24.
9. Coppa G., Pierani P., Zampini L. et al. Characterization of oligosaccharides in milk and feces of breast-fed infants by high-performance anion-exchange chromatography. In: Newburg, D.S., editor. *Bioactive Components of Human Milk*. Springer; New York, 2001, p. 307–14.
10. Danielyan L. V. , Hovhannisyan H. G. The study of lactic acid bacteria isolated from human breast milk in Armenia. *Biolog. Journal of Armenia* , 2016, Special Issue , p.13–18.
11. Fernández L., Langa S., Martín V. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol. Res.*, 2013, 69 (1), p. 1–10.
12. Gibson G.R. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J. Nutr., Suppl.*, 1999, 129, 7, p.1438–1441.
13. Gibson G.R., Roberfroid M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 1995, 125, p.1401–1412.
14. Jeurink P.M., Bergenhenegouwen J., Jimenez E. et. al. Human milk: a source of more life than we imagine. Wageningen Academic Publishers. *Beneficial Microbes*, 2013, 4 (1): 17–30.
15. Jennifer T. S., Carlito B. L., David A. Breast Milk Oligosaccharides: Structure-Function Relationships in the Neonate. *Annu. Rev. Nutr.*, 2014, 34: 143–169. doi:10.
16. Moro G., Minoli I., Mosca M. et. al. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2002, 34:291–295.
17. Marcobal A., Sonnenburg J. L. Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, July ; 18(0 4): 12–15.
18. Patel S., Goyal A. Applications of Natural Polymer Gum Arabic: A Review. *International Journal of Food Properties*, 2015, Vol.18, 5, p. 986–998.
19. Susan LaTuga M., Alison Stuebe, MD, Patrick C. Seed, A Review of the Source and Function of Microbiota in Breast Milk, *Semin. Reprod. Med.*, 2014, 32: 68–73.
20. Sela M., Pirim C., Locascio R.G., Freeman S.L. et al. Glycoprofiling bifidobacterial consumption of galacto-oligosaccharides by mass spectrometry reveals strain-specific, preferential consumption of glycans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75:7319–25.
21. Vaningelgem F., Zambir M., Adriany T., De Vuyst L. *J. Appl. Microbiol.*, 2004, Vol. 97, p. 1257–1273.